

520 145
Reg. PCT/PTO 03 JAN 2005

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. Januar 2004 (15.01.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/005506 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/007068

(22) Internationales Anmeldedatum:
2. Juli 2003 (02.07.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 29 645.6 2. Juli 2002 (02.07.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **NOVOLOGIX GMBH** [DE/DE]; Geismarland-
str. 20, 37083 Göttingen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **MAYER, Frank**
[DE/DE]; Alte Dorfstr. 34, 37120 Bovenden (DE).
SCHWIENHORST, Andreas [DE/DE]; Geismarlandstr.
20, 37083 Göttingen (DE).

(74) Anwälte: **WEICKMANN, Franz, Albert** usw.; Weick-
mann & Weickmann, Postfach 860 820, 81635 München
(DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: BACTERIAL CELL DIGESTION

(54) Bezeichnung: ZELLAUFSCHLUSS VON BAKTERIEN

(57) Abstract: The invention relates to the use of substances which bind to the bacterial elongation factor EF-Tu for cell digestion or for the lysis of cells. The invention further relates to a cell digestion system and a cell digestion method.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Verwendung von Substanzen, die an den bakteriellen Elongationsfaktor EF-Tu binden zum Zellaufschluss bzw. zur Lyse von Zellen. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Zellaufschlusssystem bzw. ein Zellaufschlussverfahren.

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/005506 A2

Zellaufschluss von Bakterien

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Substanzen, die an den bakteriellen Elongationsfaktor EF-Tu binden zum Zellaufschluss bzw. zur Lyse von Zellen. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Zellaufschlusssystem bzw. ein Zellaufschlussverfahren.

10

Zellen, insbesondere Bakterienzellen, werden häufig eingesetzt, um unter Anwendung molekulargenetischer Techniken, beispielsweise durch homologe oder heterologe Genexpression und Expression synthetisch wirksamer Enzyme, Verbindungen zu produzieren. Bevorzugt werden peptidische Verbindungen, Triglyceride, Wachsester und PHAs produziert und insbesondere solche Verbindungen, welche in der Biotechnologie, der Medizin, auf dem Pharmasektor oder in anderen Bereichen Anwendung finden können. Im Falle der heterologen Genexpression sind die gebildeten Verbindungen nicht-natürliche Komponenten der verwendeten Zellen bzw. der verwendeten Bakterien. Die Herstellung von verschiedensten Verbindungen mittels Genexpression ist im Stand der Technik umfangreich beschrieben (siehe z.B. Q. Bi et al., Applied Biochemistry & Biotechnology, 95(1) (2001) 23-30; D. Macmillan et al., Chemistry & Biology, 8(2) (2001) 133-45; J.E. de Oliveira et al., Journal of Chromatography, A, 852(2) (1999) 441-50 und M. Schmidt et al., Journal of Biotechnology, 68(1) (1999), 71-83). Auf diese Weise wurde beispielsweise rekombinantes humanes Erythropoietin, rekombinantes humanes Insulin sowie rekombinantes humanes Wachstumshormon hergestellt.

25

20

30

Die Gewinnung der in den Zellen produzierten Verbindungen, insbesondere wenn es sich um intrazellulär synthetisierte Substanzen handelt, bedingt in der Regel, dass die Zellen bzw. Bakterien lysiert werden müssen. Eine

solche Lyse ist immer dann zwingend, wenn die gewünschten Verbindungen nicht aus der lebenden Zelle ausgeschleust werden können. In diesem Fall können die gewünschten Verbindungen nur durch Lyse freigesetzt und der weiteren Verarbeitung (down-stream processing) zugeführt werden.

Um eine Lyse der Zellen zu bewirken, können beispielsweise Enzyme, wie etwa Lysozym, zugesetzt werden, welche die Zellhülle lysieren, wobei eine Lyse durch induzierte Lysozym-Expression nicht erreicht werden konnte. Ist die Zellhülle zerstört, kann die Zelle als "aufgeschlossen" gelten (T. R. Hopkins, Bioprocess Technology (New York) 12 (1991), 57-83; J.A. Asenjo et al., Bioprocess Technology (New York) 9 (1990) 143-75). Zur Lyse können auch Verfahren eingesetzt werden, bei denen mechanische Scherkräfte zur Zerstörung der Zellen zur Wirkung kommen. Ein Beispiel für ein solches Verfahren ist die Verwendung einer French Press.

Der Aufschluss von Bakterien in biotechnologischen Produktionsprozessen stellt einen erheblichen Kostenfaktor dar. Zudem treten bei den bekannten Zellaufschlussverfahren oftmals störende Nebeneffekte auf, wie beispielsweise starke Proteolyse oder das überstarke Vorhandensein von Zelltrümmern.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es deshalb, ein verbessertes Verfahren für einen Zellaufschluss bereitzustellen, insbesondere ein Verfahren, welches in biotechnologischen Produktionsprozessen vorteilhaft eingesetzt werden kann.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch die Verwendung von Substanzen, die an Bestandteile des Cytoskeletts, insbesondere an EF-Tu binden zum Zellaufschluss.

Die Entdeckung der Existenz eines bakteriellen Cytoskeletts und die Charakterisierung von Bestandteilen davon, insbesondere die Charakterisierung des Elongationsfaktors EF-Tu als einem strukturell bedeutsamen Protein für dieses Cytoskelett öffnen den Weg für ein neues System für den Zellaufschluss, insbesondere den Zellaufschluss von Bakterien. Damit wird erfindungsgemäß eine Alternative zu konventionellen Zellaufschlussverfahren bereitgestellt. Durch Destabilisierung des Cytoskeletts kann die Zellhülle zerstört und somit eine Lyse der Zellen bewirkt werden.

Erfindungsgemäß bevorzugt werden zur Destabilisierung des Cytoskeletts Substanzen verwendet, die an EF-Tu binden.

Das bakterielle Protein EF-Tu enthält die Domänen 1, 2 und 3 (H. Song et al., J. Mol. Biol. 285 (1999) 1245-1256). Die Sequenzen des Proteins EF-Tu und seines codierenden Gens sind für Escherichia coli und eine Reihe anderer Eu-Bakterien publiziert und in Datenbanken zugänglich. EF-Tu ist ein Protein, welches drei Domänen enthält. Von den 394 Aminosäuren, welche EF-Tu (von E.coli) umfasst, gehören zur Domäne 1 die Aminosäuren 8 bis 204, wobei die Aminosäuren 172 bis 204 eine Verbindungsstruktur zur Domäne 2 bilden. Zur Domäne 2 gehören die Aminosäuren 205 bis 298 und zur Domäne 3 gehören die Aminosäuren 299 bis 394.

Erfindungsgemäß wurde überraschenderweise festgestellt, dass man beim bakteriellen Cytoskelett durch Hemmung des Self-Assembly von EF-Tu-Fibrillen eine Destabilisierung und in der Folge eine Lyse der Zellen erreichen kann.

EF-Tu ist ein 3-Domänen-Protein, wie in Figur 1 dargestellt. Die Protofilamente des Cytoskeletts entstehen in der lebenden Zelle dadurch, dass die Domänen 2 und 3 von EF-Tu-Proteinen (Monomer oder integriert in ein Protofilament und nur transient frei) mit den Domänen 3 und 2

benachbarter EF-Tu-Proteine wechselwirken. Durch Ausbildung spezifischer nicht-kovalenter Bindungen, wobei Domäne 2 des einen EF-Tu mit Domäne 3 des benachbarten EF-Tu wechselwirkt, während eines self assembly Prozesses entstehen auf diese Weise Ketten, sogenannte Protofilamente, welche sich zu einem Netzwerk verbinden (vgl. Figur 2). Mit diesem Netzwerk können weitere Faktoren assoziiert sein, wie z.B. FtsZ, MreB oder/und M6I.

Stabilität und/oder Ausprägung solcher Protofilamente und Netzwerke in Bakterienzellen können erfindungsgemäß unterbunden werden, wobei als Folge der Tod der Bakterienzelle durch Lyse eintritt.

Eine besonders vorteilhafte Vorgehensweise der Erfindung ist wie folgt. Der DNA-Abschnitt des EF-Tu-Gens von Escherichia coli, welcher für die Domäne 3 codiert, wird gewonnen und mittels molekulargenetischer Techniken in E.coli-Zellen transferiert und exprimiert. Neben diesem rekombinanten Abschnitt, welcher ausschließlich die Domäne 3, nicht aber die Domänen 1 und 2 von EF-Tu enthält, verfügen die Zellen nach wie vor über das native EF-Tu-Gen und können es exprimieren. Die zusätzlich synthetisierten Domäne 3-Polypeptide konkurrieren jedoch mit den nativen EF-Tu-Proteinen um die Bindungsplätze für die Ausbildung der Protofilamente. Wird ein Domäne-3-Polypeptid anstelle eines nativen EF-Tu-Proteins als Kettenglied eingebaut, führt dies aufgrund des Fehlens der zweiten Bindestelle (die Domäne 2 ist für die Kettenbildung unabdingbar) am Domäne-3-Polypeptid zum Kettenabbruch. Das Protofilament wächst nicht weiter, das cytoskelettale Netzwerk wird geschwächt und kollabiert schließlich. Als Folge des Verlustes der Integrität des Cytoskelettes verliert die cytoplasmatische Membran der Zelle ihre Aufhängung. Die cytoplasmatische Membran ist, wie aus Figur 4 ersichtlich, am Cytoskelett aufgehängt. Dadurch wird die Zellwand, die in der lebenden Bakterienzelle durch die cytoplasmatische Membran positioniert und gestützt wird, zerstört (siehe Figur 5). Der Verlust von Zellwand und cytoplasmatischer Membran

bedeutet eine Exposition des Zellinhalts, sodass die Zelle lysiert ist (vgl. Figuren 5 und 6). Der Zellinhalt kann somit ohne weiteren Zellaufschluss gewonnen werden.

- 5 Zellen, welche für biotechnologische Produktionsprozesse eingesetzt werden, wie etwa heterologe Expression, Produktion von Proteinen, insbesondere für biotechnologische oder medizinische Zwecke, können somit aufgeschlossen werden, indem man in sie vor ihrem Einsatz für die Produktion eine Sequenz einbringt, welche für die der Zellen-Species
10 entsprechende Domäne des EF-Tu codiert.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthalten die zum Zellaufschluss verwendeten Substanzen Anteile, die im Bereich der Aminosäuren 218 bis 224 von Domäne 2 und/oder im Bereich der Aminosäuren 317 bis 328
15 oder/und 343 bis 354 von Domäne 3 an EF-Tu binden. Innerhalb der Domänen 2 und 3 treten unterschiedliche Sekundärstrukturen auf. Von besonderem Interesse sind dabei die Aminosäuresequenzen von 317 bis 328 und von 343 bis 354, welche in Domäne 3 liegen und Schleifen bilden, die frei in den Raum ragen und Kandidatensequenzen für eine
20 Wechselwirkung mit Aminosäuresequenzen sind, welche in einer entsprechend positionierten Eindellung an der Peripherie von Domäne 2 liegen, wobei diese Sequenzen von Aminosäuren 218 bis 224 reichen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden intrazellulär
25 exprimierte peptidische Substanzen eingesetzt, welche auf Oligopeptiden basieren, welche an EF-Tu, vorzugsweise im Bereich der Passungsstellen der Domänen 2 oder/und 3 binden. Diese Oligopeptide können Teilabschnitte der Aminosäuresequenzen der Domänen 2 oder/und 3 mit einer Länge von vorzugsweise 4 bis vorzugsweise 20 Aminosäuren,
30 besonders bevorzugt 5 bis 15 Aminosäuren und insbesondere bevorzugt mit einer Länge von 6 bis 12 Aminosäuren enthalten.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthalten die Substanzen Teilabschnitte oder den Gesamtbereich der Aminosäuresequenzen aus der Domäne 3 mit einer Länge von mindestens 4 und insbesondere mindestens 5 Aminosäuren und der gleichzeitig keinem Abschnitt der Aminosäuresequenzen aus der Domäne 2 entspricht.

Neben intrazellulär exprimierten peptidischen Verbindungen können auch intrazellulär exprimierte Peptidomimetika vorteilhafterweise eingesetzt werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Aufschluss von Zellen, bei dem man in den Zellen Bestandteile des Cytoskeletts destabilisiert. Cytoskelettale Elemente, die verändert werden können, um eine Schwächung des Cytoskeletts zu bewirken, umfassen beispielsweise FtsZ, MReB, Mbl und kontraktile Proteine und insbesondere EF-Tu.

Besonders bevorzugt werden bei diesem Verfahren Substanzen eingesetzt, welche an Bestandteile des Cytoskeletts, insbesondere an EF-Tu binden und hierin zuvor erläutert sind.

Die Erfindung kann besonders vorteilhaft angewendet werden in einem Verfahren zur Herstellung einer Verbindung, beispielsweise eines Proteins, indem man Zellen verwendet, in welchen dieses Protein, beispielsweise durch einen biotechnologischen Produktionsprozess exprimiert wird und indem man in diese Zellen zuvor eine Sequenz einbringt, die für eine Substanz codiert, welche Bestandteile des Cytoskeletts der Zellen destabilisiert. Die bei einer herkömmlichen biotechnologischen Prozessführung zur Gewinnung der gebildeten Verbindungen in gentechnisch manipulierten Bakterien üblicherweise erforderliche Lyse kann hier mit dem hierin beschriebenen Zellaufschluss durchgeführt werden. Vorteilhaft ist, dass der Zellaufschluss zu einem genau definierten Zeitpunkt durchgeführt werden kann. Ein Indikator hierfür kann das

Erreichen der gewünschten Zelldichte (quorum sensing) sein. Eine Induktion der Lyse durch quorum sensing erfolgt dadurch, dass die Zellkultur in ihrem Wuchsverhalten kontrolliert wird und bei Feststellung, dass der gewünschte Zustand der Zellkultur erreicht ist, das eingebrachte Gen exprimiert wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird in die Zellen ein Konstrukt eingebracht, welches neben dem Gen für die destabilisierende Substanz weitere codierende Sequenzen enthält, die es erlauben, den Beginn der Synthese der Substanz, beispielsweise des Domäne-3-Polypeptids von außen zu induzieren. Auf diese Weise ist es möglich, den Zeitpunkt der Zell-Lyse in der Zellkultur von außen exakt zu steuern.

Die Induktion durch einen quorum-gekoppelten oder/und Zellkultur-autarken Prozess ist eine weitere geeignete Form zur Einleitung der Zell-Lyse.

Die Erfindung umfasst weiterhin ein Konstrukt, umfassend eine Sequenz, welche für eine Bestandteile des Cytoskeletts von Zellen destabilisierende Substanz codiert. Dieses Konstrukt umfasst bevorzugt weiterhin mindestens einen Genabschnitt, welcher die Induktion der Synthese der das Cytoskelett destabilisierenden Substanz erlaubt.

Vorteilhafte Auslegungen des Konstrukts sind in Figur 7 dargestellt. Sobald die Induktion erfolgt ist, wird innerhalb einer Zellgeneration durch das Zusammenspiel von EF-Tu, Domäne-3-Polypeptid, cytoplasmatischer Membran und Zellwand die Lyse der Zellen herbeigeführt.

Die Erfindung wird durch die beigefügten Figuren und die nachfolgenden Beispiele weiter erläutert.

In den Figuren zeigt:

Fig. 1

- a) EF-Tu (GDP-Form aus E.coli; Ergebnis einer Röntgenstrukturanalyse; Abbildung aus der Literatur entnommen und modifiziert). Die 3 Domänen des Proteinmoleküls sind markiert. A' und b bezeichnen Verbindungssequenzen
- b) Wie a), jedoch andere Form der Darstellung. Die Zahlen markieren die Positionen der Aminosäure-Reste; N-Terminus und C-Terminus sind angegeben.

Fig. 2

- a) EF-Tu-Molekül
- b) und c) Prinzip der "Kettenbildung" (Self-Assembly von EF-Tu-Monomeren zu Protofilamenten). Die Bindung erfolgt durch Kontakt zwischen den Domänen 2 und 3 benachbarter Moleküle
- d) Elektronenmikroskopische Abbildung eines solchen Protofilaments, isoliert aus dem Bakterium *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*
- e) Netzwerk, bestehend aus Protofilamenten. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines aus dem Bakterium *Th. Thermosaccharolyticum* isolierten Netzwerks. Die schwarzen Punkte sind für Markierungszwecke eingesetzte Gold-Marker.

Fig.3

Es sollen EF-Tu-GFP-His-Fusionsklone generiert werden. Idealer Fusionspunkt bei EF-Tu ist der C-Terminus, der zwischen Domäne 2 und 3 hervorragt (Song et al., 1999). Der gleiche Fusionspunkt kann auch für ein Domäne-3-Fusionskonstrukt gewählt werden. Das Domäne-3-Fusionskonstrukt kann für in vivo-Kompetitionsexperimente eingesetzt werden. Dabei scheint es sinnvoll, für chemische Labeling-Alternativen ein C-terminales Cystein (das einzige in Domäne 3) einzuführen.

Ausgangspunkt ist genomische DNA eines E.coli-K-12-Stammes. Im Hinblick auf mögliche, spätere Experimente in vitro erscheint es sinnvoll, alle Konstrukte auch mit His-Tag zu versehen.

(a1) Einführung eines His-Tag in die BsrGI/EcoRI-Schnittstellen des Vektors pEGFP

(a2) Einführung des EF-Tu-Gens in die HindIII/NcoI-Schnittstellen des Vektors pEGFP(His)

(a3) Einführung des Domäne-3-Genabschnitts in die HindIII/NcoI-Schnittstellen des Vektors pEGFP(His)

(b1) Basensequenz des Konstruktes pEGFP-EF-Tu-His am Beispiel des Klons HE1 (SEQ ID NO:1)

(b2) Basensequenz des Konstruktes pEGFP-Domäne3-His am Beispiel des Klons HD1 (SEQ ID NO:2)

Fig. 4

"Aufhängung" der cytoplasmatischen Membran (CM) bei dem wandlosen Bakterium *Mycoplasma pneumoniae*. Elektronenmikroskopische Aufnahmen.

a) Unbehandeltes Bakterium. Der Pfeil deutet auf die CM

b), c), d) Nach Ablösen der CM (durch ein Detergenz) wird erkennbar, dass die CM an Stützen ("stalks") aufgehängt war, welche ihrerseits dem peripheren Teil des Cytoskeletts aufsitzen. Wird dieser Teil des Cytoskeletts geschwächt oder zerstört, verlieren die "stalks" ihre feste Verankerung und die CM kollabiert.

Fig. 5

Versuche mit E.coli. Elektronenmikroskopische Aufnahmen, Negativkontrastierung

a) Intakte Bakterienzellen, enthaltend ihr Chromosom und zusätzlich einen Leervektor (Plasmid), welcher in weiterführenden Versuchen als Vektor zum Einbringen des Domäne-3-Genabschnitts verwendet wurde. Diese Zellen stellen also Kontrollen dar.

- b) Zellen einer jungen Kultur. In diese Zellen war vor Beginn der Kultivierung zusätzlich zum eigenen nativen Chromosom (welches ja das Gen enthält, welches intaktes EF-Tu codiert) ein Plasmid eingebracht worden, welches in exprimierbarer Form den Genabschnitt enthält, welcher für Domäne-3 von EF-Tu codiert. Der Effekt der Expression dieses "truncated" Gens ist deutlich zu sehen: Neben einigen intakt erscheinenden Zellen (sie sind bei genauerer Analyse als bereits in ihrer Zellhülle geschwächt erkennbar), wird das Bild bestimmt durch Zellreste, welche noch die ursprüngliche Zellform erkennen lassen, jedoch weder Wand noch CM besitzen. Wand und CM haben durch die Destabilisierung des Cytoskeletts ihre Aufhängung verloren. Der Zellinhalt ist exponiert. Ein solcher Zustand wird gemeinhin als "aufgeschlossen" bezeichnet.
- c) Endstadium der Auflösung der Zellen (alte Kultur). Eine ehemalige Zellform ist nicht mehr erkennbar; die Zellreste bilden unorganisierte Aggregationen

Fig. 6

Versuche mit E.coli. Elektronenmikroskopische Aufnahmen

- a) Endstadium der Auflösung der Zellen einer Kultur, in denen Domäne 3 von EF-Tu zusätzlich zum zelleigenen EF-Tu exprimiert wurde; Ultradünnschnitt (vgl. Abb. 5 b) und c))
- b) Kontrolle: Zelle mit Leervektor; die Zelle ist intakt (vgl. Abb. 5 a))
- c) Kontrolle: In der Zelle wurde zusätzlich zum zelleigenen EF-Tu noch per genetic engineering eingebrachtes EF-Tu exprimiert; die Zelle ist intakt

Fig. 7

Chromosomale Integration eines möglichen Konstrukts der Domäne 3 von Ef-Tu mit regulierbarem Promotor und Resistenzmarker unter Zuhilfenahme der Attachment sites des Phagen Lambda. Promotor und Resistenz können je nach Bedarf auch in anderen Kombinationen eingesetzt werden.

Att	attachment sites
Spec R	Spektinomycin-Resistenz
LacI	Repressor
P _{LacO-1}	modifizierter Lac-Promotor (nach LUTZ und BUJARD, 1997)

5

Als Alternativen zum angegebenen Promotor können beispielsweise auch die Promotoren ara, T7 oder bdA (quorum sensing) eingesetzt werden.

Beispiele

10 Beispiel 1

Ablauf von der Klonierung bis zur Expression und Aufreinigung der Konstrukte EF-Tu-His bzw. Domäne 3-His (schematisiert):

1. Präparation der genomischen DNA von E.coli XL1-Blue (K12-Derivat)
- 15 2. PCR mit den entsprechenden Primern zur Hochverstärkung der Volllängenprodukte
3. Identifizierung und Aufreinigung der PCR-Volllängenprodukte
4. Restriktionsverdau der PCR-Produkte und des Zielvektors
5. Ligation der PCR-Produkte in den Zielvektor
- 20 6. Elektroporation der ligierten Plasmid-DNA in den Stamm XL1-Blue
7. Identifizierung der Klone mit dem richtigen Insert durch Restriktionsverdau und Sequenzanalyse
8. Sicherung der Klone als Kryokulturen
9. Ausplattierung der Klone auf Selektionsagar (hier: LB/Ampicillin) und
- 25 Anzucht über Nacht bei 37 °C
10. Animpfen einer 50 ml LB/Ampicillin-Flüssigkultur, Inkubation über Nacht bei 37 °C
11. Animpfen einer 1 l LB/Ampicillin-Flüssigkultur, Inkubation bei 37 °C bis zu einer OD600 von ca. 0,5 bis 0,7, Induktion mit IPTG für
- 30 mindestens 4 h
12. Zellernte
13. Homogenisierung durch Druck/Ultraschall

14. Abzentrifugieren der Zelltrümmer

15. Aufreinigung des so geklärten Zelllysats über IMAC-Säulen

IPTG Isopropylthiogalaktosid

5 IMAC Ion Metal Affinity Chromatographie

Ansprüche

- 5 1. Verwendung von Substanzen, die an Bestandteile des Cytoskeletts, insbesondere an EF-Tu binden, zum Zellaufschluss.
2. Verwendung nach Anspruch 1 zum Zellaufschluss von Bakterienzellen.
- 10 3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanzen im Bereich der Domäne 2 (Aminosäuren 205 bis 298) oder/und der Domäne 3 (Aminosäuren 299 bis 349) an EF-Tu binden.
- 15 4. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanzen im Bereich der Aminosäuren 218 bis 224 von Domäne 2 oder/und im Bereich der Aminosäuren 317 bis 328 oder/und 343 bis 354 von Domäne 3 an EF-Tu binden.
- 20 5. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanzen Teilabschnitte der Aminosäuresequenzen aus den Domänen 2 oder/und 3 mit einer Länge von mindestens vier Aminosäuren enthalten.
- 25 6. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Teilabschnitte eine Länge von 5 bis 15 Aminosäuren, insbesondere von 6 bis 12 Aminosäuren aufweisen.
- 30

7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Substanzen die Domäne 3 von EF-Tu und keine weitere
Domäne von EF-Tu enthalten.

5

8. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Substanzen ausgewählt werden aus linearen oder
cyclischen peptidischen Verbindungen oder Peptidomimetika.

10

9. Verfahren zum Aufschluss von Zellen,
dadurch gekennzeichnet,
dass man in den Zellen Bestandteile des Cytoskeletts destabilisiert.

15

10. Verfahren nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
dass man zur Destabilisierung Substanzen einsetzt, welche an
Bestandteile des Cytoskeletts binden.

20

11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10,
dadurch gekennzeichnet,
dass man Substanzen, die an EF-Tu binden einsetzt.

25

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
dass man Substanzen einsetzt, die im Bereich der Domäne 2
(Aminosäuren 205 bis 298) oder/und der Domäne 3 (Aminosäuren
299 bis 394) an EF-Tu binden, insbesondere im Bereich der
Aminosäuren 218 bis 224 von Domäne 2 oder/und im Bereich der
Aminosäuren 317 bis 328 oder/und 343 bis 354 von Domäne 3.

30

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 oder 13,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass man Substanzen einsetzt, welche Teilabschnitte der
Aminosäuresequenzen aus den Domänen 2 oder/und 3 mit einer
Länge von mindestens 4 Aminosäuren, insbesondere von mindestens
5 Aminosäuren enthalten.

5

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 13,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass Nukleinsäuren in die Zellen eingebracht werden, die für die das
Cytoskelett destabilisierenden Substanzen codieren.

10

15. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass man Zellen verwendet, in welche eine Sequenz eingebracht
worden ist, codierend für eine Verbindung, welche Bestandteile des
Cytoskeletts der Zellen destabilisiert, die Zellen kultiviert und so die
gewünschte intrazelluläre Verbindung gewinnt.

15

16. Verfahren nach Anspruch 15,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass man die gewünschte Verbindung durch Kultivierung der Zellen
intrazellulär produziert und in einem zweiten Schritt eine Lyse der
Zellen durch Induktion der Expression der das Cytoskelett
destabilisierenden Verbindung bewirkt.

20

25

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 16,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass die gewünschte Verbindung durch heterologe Expression
gebildet wird.

30

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 16,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,

dass die gewünschte Verbindung durch homologe Expression gebildet wird.

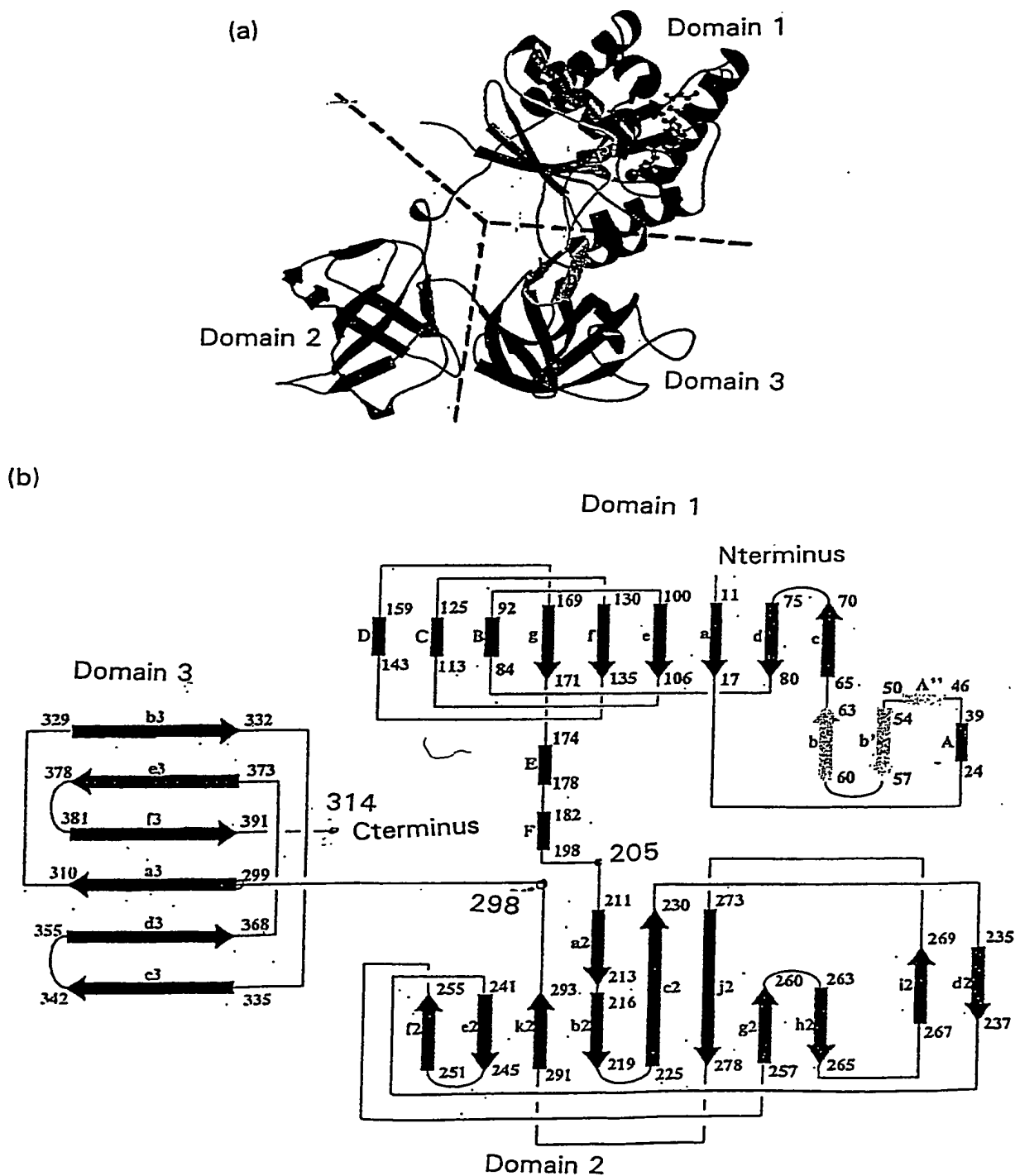
5 19. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 20,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass die Induktion durch quorum sensing erfolgt.

10 20. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 20,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass die für eine das Cytoskelett der Zellen destabilisierende
Verbindung codierende Sequenz in einem Konstrukt in die Zellen
eingebracht wird, wobei das Konstrukt weitere Regionen enthält, die
eine Induktion der Synthese der Verbindung erlauben.

15 21. Konstrukt, umfassend eine Sequenz, welche für eine Bestandteile
des Cytoskeletts von Zellen destabilisierende Verbindung codiert.

20 22. Konstrukt nach Anspruch 21, weiterhin umfassend einen
Genabschnitt, welcher die Induktion der Synthese der das
Cytoskelett destabilisierenden Verbindung erlaubt.

Figur 1



Figur 2

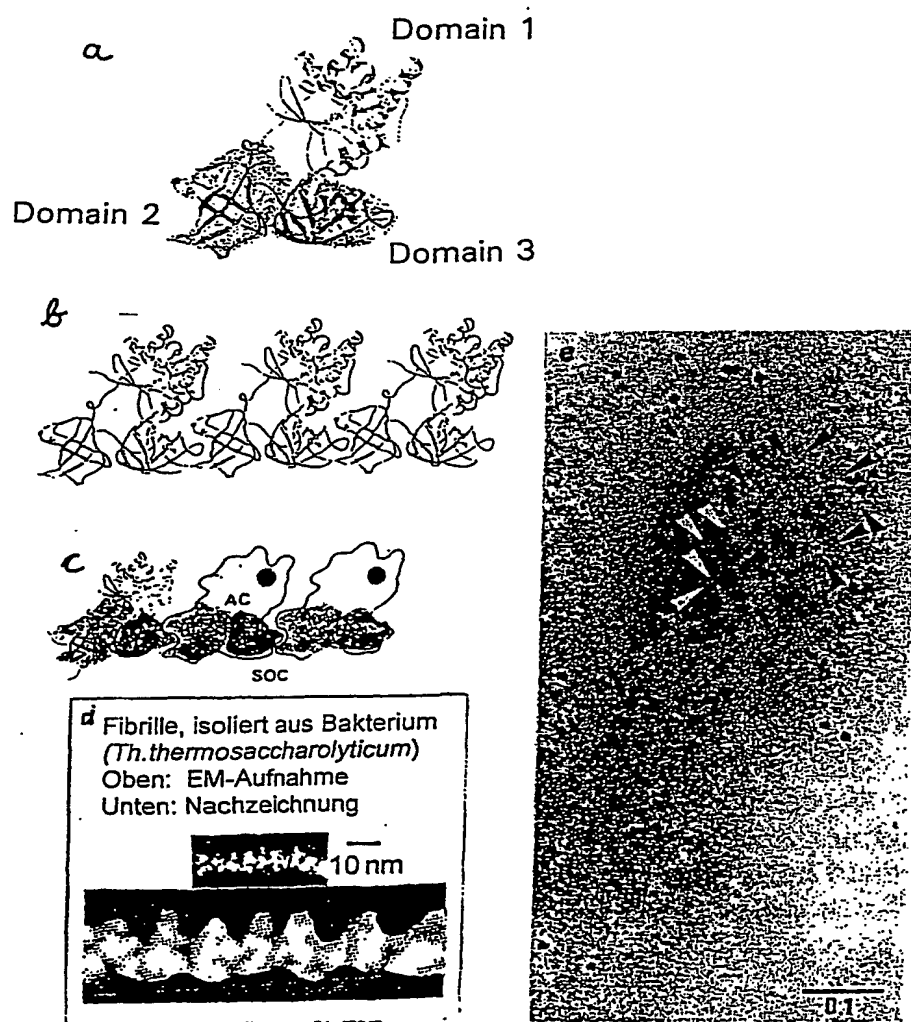


Fig. 3

(a1)

Vektor pEGFP (Clontech):

<i>BsrGI</i>				STOP				<i>EcoRI</i>					
GAC	GAG	CTG	TAC	AAG	<u>TAA</u>	AGC	GGC	CGC	GAC	TCT	AGA	ATT	CCA
CTG	CTC	GAC	ATG	TTC	ATT	TCG	CCG	GCG	CTG	AGA	TCT	TAA	GGT

BsrGI-Schnittstelle:

T GTACA
ACATG T

EcoRI-Schnittstelle:

G AATTC
CTTAA G

Synthetisch hergestelltes Oligonukleotid zur Einklonierung des His-Tags in den Vektor:

```

5' BsrGI                                     BsrGI      EcoRI 3'
G TAC AAG CTT CAT CAC CAT CAC CAT CAC TAA CTG TAC AAG TAAG
      TTC GAA GTA GTG GTA GTG GTA GTG ATT GAC ATG TTC ATTCTTAA
3'
Tyr-Lys-Leu-His-His-His-His-His-His-STOP-
5'

```

Ergebnis: pEGFP(His)

(a2)

Vektor pEGFP(His):

GCC TGC AGG -% - ACC ATG GTG
CGG ACG TCC -% - TGG TAC CAC

PstI-Schnittstelle:

CTGCA G
G ACGTC

NcoI-Schnittstelle:

C CATGG
GGTAC C

Fusionsstellen zum EF-Tu-Gen:

Start EF-Tu										Start EGFP				
5'	<i>PstI</i>								<i>HindIII</i>		<i>NcoI</i>		3'	
ACT	AGC	TGC	AGC	ATG	TCT	AAA	-%	CTG	GGC	AAG	CTT	ACC	ATG	GTG
TGA	TCG	ACG	TCG	TAC	AGA	TTT	-%	GAC	CCG	TTC	GAA	TGG	TAC	CAC
3'														5'
Thr-Ser-Cys-Ser-Met-Ser-Lys-----Leu-Gly-Lys-Leu- Thr-Met-Val														

(a3)

Fusionsstellen zur Domäne 3:

```
5'      PstI                      Cys HindIII      NcoI      3'
ACT AGC TGC AGC GCT AAG CCG -%- CTG GGC TGC AAG CTT ACC ATG GTG
TGA TCG ACG TCG CGA TTC GGC -%- GAC CCG ACG TTC GAA TGG TAC CAC
3'                                     5'
Thr-Ser-Cys-Ser-Ala-Lys-Pro-----Leu-Gly-Cys-Lys-Leu-Thr-Met-Val
```

Sequenz des Konstrukts EF-Tu-GFP-His im Vektor pEGFP (Clontech) (SEQ ID NO:1)

(b1)

pEGFP-Vektor:

AGCGCCCAAT AGCAAACCG CCTCTCCCCG CGGTTGGCC GATTCATTAA TGCAGCTGGC ACGACAGGTT TCCCAGACTGG
 AAAGCGGGCA **ATGCTCTATG** **ATGCTCTATG** **ATGCTCTATG** **ATGCTCTATG** **ATGCTCTATG** **ATGCTCTATG** **ATGCTCTATG** **ATGCTCTATG**
 CATGCCATCAAGC

EF-Tu:

ATGTCTAAAG AAAAATTGA ACGTACAAA CCGCACGTTA ACGTTGGTAC TATCGGCCAC GTTGACCACG GTAAACTAC
 TCTGACCGCT GCAATCACCA CCGTACTGGC TAAACCTAC GCGGTGCTG CTCTGTGCATT CGACCAGATC GATAACGCGC
 CGGAAGAAAA AGCTCGTGGT ATCACCATCA ACACCTCTCA CGTTGAATA GACACCCCGA CCCGTCACTA CGCACACGTA
 GACTGCCCGG GGCACGCCGA CTATGTTAAA AACATGATCA CCGGTGCTGC TCAGATGGAC GCGCGGATCC TGGTAGTTGC
 TCGGACTGAC GGCCCGATGC CGCAGACTCG TGAGCACATC CTGCTGGGTC GTCAGGTAGG CGTTCCGTAC ATCATCGTGT
 TCCTGAACAA ATGCGACATG GTTGATGACG AAGAGCTGCT GAACTGGT GAAATGGAAG TTCGTGAAC TCTGTCTCAG
 TACGACTCC CGGCGGACGA CACTCCGATC GTTCGTGGTT CTGCTCTGAA AGCGCTGGAA GCGGACGCAG AGTGGGAAGC
 GAAATCCTG GAACTGGCTG GCTTCCTGGA TTCTTAATT CCGGAACCAAG AGCGTGCAT TGACAAAGCCG TTCCTGCTGC
 CGATCGAAGA CGTATTCTCC ATCTCCGGTC GTGGTACCCT TGTACCCGGT CGGTATCAT CAAAGTTGGT
 GAAGAAGTTG AAATCGTTGG TATCAAAGAG ACTCAGAAGT CTACCTGTAC TGGCGTTGAA ATGTTCCGCA AACTGCTGGA
 CGAAGGCCGT GCTGGTGAGA ACGTAGGTGT TCTGCTGCGT GGATCAAACT GTGAAGAAAT CGAACGTGGT CAGGTACTGG
 CTAAGCCCGG CACCATCAAG CCGCACACCA AGTTCGAATC TGAAGTGTA ATTCTGTCCA AAGATGAAG CGGCCGTCTAT
 ACTCCGTTCT TCAAAGGCTA CCGTCCGCAG TTCTACTTCC GTACTACTGA CGTGACTGGT ACCATGAAC TGCCGGAAAG
 CGTAGAGATG GTAATGCCGG GCGACAACAT CAAAATGGTT GTTACCCTGA TCCACCCGAT CCGGATGGAC GACGGTCTGC
 GTTTCGCAAT CCGTGAAGGC GGCCGTACCG TTGGCGCGGG CGTTGTAGCT AAAGTTCTGG GC

pEGFP-Vektor:

AAGCTTA**AG**

GFP:

ATGGTAGCA AGGGCGAGGA GCTGTTCAAC GGGGTGGTGC CCATCCTGCT CGAGCTGGAC GCGACGTAA ACGGCCACAA

GTTCAGCGTG TCCGGCGGAGG GCGAGGGCGGA TGCCACCTTAC GGCAAGCTGA CCTGAAAGTT CATCTGCACC ACCGGCAAGC
 TGCCCGTGCC CTGGCCCAACC CTCGTGACCA CCTGACCTA CGCGTGCAG TGCTTCAGCC GTTACCCCGA CCACATGAAG
 CAGCACGACT TCTTCAAGTC CGCCATGCCG GAAGGCTACG TCCAGGAGCG CACCATCTTC TTCAAGGAGG ACGGCAACTA
 CAAGACCCGC GCCGAGGTGA AGTTCGAGG CGACACCTTG GTGAACCGCA TCGAGCTGAA GGGCATCGAC TTCAAGGAGG
 ACGGCAACAT CCTGGGGCAC AAGCTGGAGT ACAACTACAA CAGCCACAAC GTCTATATCA TGGCCGACAA GCAGAAGAAC
 GGCATCAAGG TGAACCTCAA GATCCGCCAC AACATCGAGG ACGGCAGCGT GCAGCTCGCC GACCACTACC AGCAGAACAC
 CCCCATCGGC GACGGGCCCCG TGCTGCTGCC CGACAACCAC TACCTGAGCA CCCAGTCCGC CCTGAGCAAA GACCCCAACG
 AGAAGCGCGA TCACATGGTC CTGCTGGAGT TCGTGACCGC CGCCGGGATC ACTCTCGGCA TGGACGAGC **CTTCAAG**

His-Tag:

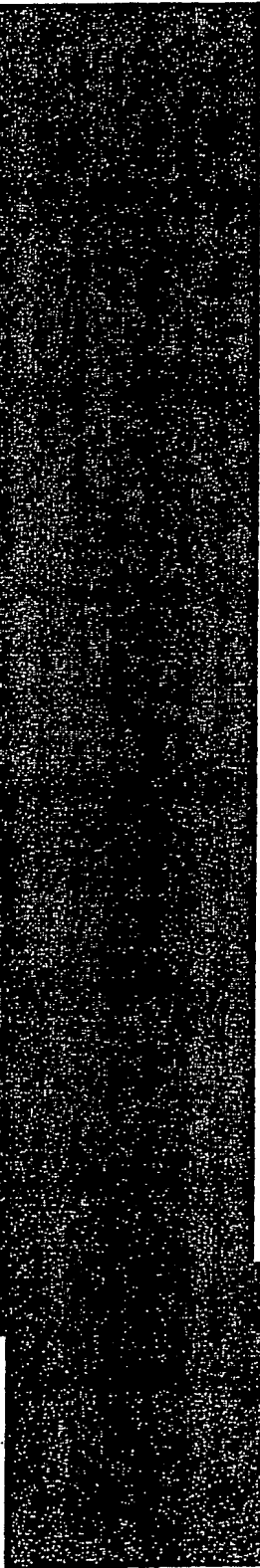
CTTCATCACC ATCACCATCA CTAAGTGTAC AAGTAA **CAATTCG**

pEGFP-Vektor:

CAACTGAGCG CCGGTCGCTA CCATTACCAA CTTGTCTGGT GTCAAAAATA ATAGGCCTAC TAGTCGGCCG TACGGGCCCT
 TTCGTCTCGC GCGTTTCGGT GATGACGGTG AAACCTCTG ACACATGCAG CTCCTGGAGA CGGTACAGC TTGTCTGTAA
 GCGGATGCCG GGAGCAGACA AGCCCGTCAG GCGGCGTCAG CCGGTGTGG CCGGTGTCCG GGTGGCTTA ACTATGCGGC
 ATCAGAGCAG ATTGTACTGA GAGTGACCA TATGCGGTGT GAAATACCGC ACAGATCCGT AAGGAGAAAA TACCGCATCA
 GCGGCGCTTA AGGCGCTCGT GATACGCCCTA TTTTATAGG TTAATGTCTAT GATAATAATG GTTCTTTAGA CGTCAGGTGG
 CACTTTTCGG GGAATGTGC GCGGAACCCC TATTGTGTTA TTTTCTTAAA TACATTCAA TATGTATCCG CTCATGAGAC
 AATAACCCCTG ATAAATGCTT CAATAATATT GAAAAAGGAA GAGT

CCCTCCCGTA TCGTAGTTAT CTACACGACG GGGAGTCAGG CAACTATGGA TGAACGAAAT AGACAGATCG CTGAGATAGG

TGCCTCACTG ATTAAGCATT GGTAACCTGC AGACCAAGTT TACTCATATA TACTTTAGAT TGATTAAAA CTTCAATTTT
 AATTAAAAAG GATCTAGGTG AAGATCCTTT TTGATAATCT CATGACCAAA ATCCCTTAAC GTGAGTTTTC GTTCCACTGA
 GCGTCAGACC CC



GGCC TTTTGCTGGC CTTTGCTCA CATGTTCTTT CCTGCGTTAT CCCCTGATTC TGTGGATAAC
 CGTATTACCG CCTTGAGTG AGCTGATACC GTCGCGCGCA GCCGAACGAC CGAGCGCAGC GAGTCAGTGA GCGAGGAAGC
 GGAAG

Sequenz Lac-Promotor

Sequenz Lac-Operator

Sequenz Ribosomen-Bindungsstelle

Sequenz Ampicillin-Resistenz-Gen

Sequenz pUC Plasmid-Replikations-Origin

Klonierungssstellen

1. CTTGAC PstI
2. CCAATGG NcoI
3. CATACA BsrGI
4. GATCG EcoRI

Die Sequenz enthält vier silent mutations (■■■■), die laut Sequenzanalyse eindeutig vorhanden sind:

- (1) Soll: TAT, Ist: TAA -> Tyr; Codon usage (gesamtes Genom E. coli) ändert sich von 16,2 zu 12,2
 - (2) Soll: TAC, Ist: TAA -> Tyr; Codon usage (gesamtes Genom E. coli) ändert sich von 12,2 zu 16,2
 - (3) Soll: GCA, Ist: GCG -> Ala; Codon usage (gesamtes Genom E. coli) ändert sich von 20,1 zu 33,6
 - (4) Soll: ATT, Ist: ATA -> Ile; Codon usage (gesamtes Genom E. coli) ändert sich von 30,3 zu 25,1
- (Frequenz pro Tausend)

Sequenz des Konstrukts Domäne 3 von EF-Tu-GFP-His im Vektor pEGFP (Clontech) (SEQ ID NO:2)
(b2)

pEGFP-Vektor:

AGCGCCCAAT ACGCAAAACCG CCTCTCCCCG CGCGTTGGCC GATTCAATTA TGCAGCTGGC ACGACAGGTT TCCCGACTGG
AAAGCGGGCA
CATGCCGCGAAGC

Domäne 3 von EF-Tu:

GCTAAGCCGG GCACCATCAA GCCGCACACC AAGTTCGAAT CTGAAGTGA CATTCTGTCC AAAGATGAAG GCGGCCGTCA
TACTCCGTTC TTCAAAGGCT ACCGTCCGCA GTTCTACTTC CGTACTACTG ACGTGAAGTT TACCATGAA CTGCCGGAAG
GCGTAGAGAT GGTAAATGCCG GCGGACAACA TCAAAATGGT TGTTACCCCTG ATCCACCCCGA TCGCGATGGA CGACGGTCTG
CGTTTCGCAA TCCGTGAAGG CGGCCGTACC GTTGGCGCGG GCGTTGTAGC TAAAGTTCTG GGCTGC

pEGFP-Vektor:

AAGCTTAAAG

GFP:

ATGCTGAGCA AGGGCGAGGA GCTGTTTACC GGGGTGGTGC CCATCCTGGT CGAGCTGGAC GCGACGTAA ACGGCCACAA
GTTCAGCGTG TCCGGCGAGG GCGAGGGCGA TGCCACCTAC GGCAAGCTGA CCTGAAAGTT CATCTGCACC ACCGGCAAGC
TGCCCGTGCC CTGGCCACCC CTCGTGACCA CCTGACCTA CGGCGTGCAG TGCTTCAGCC GTTACCCCGA CCACATGAAG
CAGCACGACT TCTTCAAGTC CGCCATGCC GAAGGCTACG TCCAGGAGCG CACCATCTTC TTCAAGGACG ACGGCAACTA
CAAGACCCGC GCGAGGTGA AGTTCGAGG CGACACCCCTG GTGAACCGCA TCGAGCTGAA GGGCATCGAC TTCAAGGAGG
ACGGCAACAT CCTGGGGCAC AAGCTGGAGT ACAACTACAA CAGCCACAAC GTCTATATCA TGGCCGACAA GCAGAAGAAC
GGCATCAAGG TGAACCTCAA GATCCGCCAC AACATCGAGG ACGGACGCGT GCAGCTCGCC GACCACTACC AGCAGAACAC
CCCCATCGGC GACGGCCCCG TGCTGCTGCC CGACAACCCAC TACCTGAGCA CCCAGTCCGC CCTGAGCAAA GACCCCAACG
AGAAGCGCGA TCACATGGTC CTGCTGGAGT TCGTGACCGC CGCCGGGATC ACTCTCGGCA TGGACGAGCCTGCTAAG

His-Tag:

CTTCATCACC ATCACCATCA CTAACGTGAC AAGTAAAGAAATCG

pEGFP-Vektor:

CAACTGAGCG CCGGTCGCTA CCATTACCAA CTTGTCCTGGT GTCAAAAATA ATAGGCCTAC TAGTCGGCCG TACGGGCCCT
TTCGTCTCGC GCGTTTCGGT GATGACGGTG AAAACCTCTG ACACATGCAG CTCCCGGAGA CCGTCACAGC TTGTCTGTAA
GCGGATGCCG GGAGCAGACA AGCCCGTCAG GCGCGGTCAG CCGGTGTGG CCGGTGTCGG GGCTGGCTTA ACTATGCGGC
ATCAGAGCAG ATTGTACTGA GAGTGACCA TATGCGGTGT GAAATACCGC ACAGATGCGT AAGGAGAAAA TACCGCATCA
GGCGGCCTTA AGGGCCTCGT GATACGCCCTA TTTTATAGG TTAATGTCTAT GATAATAATG GTTCTTAGA CGTCAGGTGG
CACTTTTCGG GGAATGTGC GCGGAACCC TATTGTTTA TTTTCTAAA TACATTCAA TATGTATCCG CTCATGAGAC
AATAACCCCTG ATAAATGCTT CAATAATATT GAAAAAGGAA GAGT

CCCTCCCGTA TCGTAGTTAT CTACACGACG GGGAGTCAGG CAACTATGGA TGAACGAAAT AGACAGATCG CTGAGATAGG
TGCCCTCACTG ATTAAGCATT GGTAACCTGC AGACCAAGTT TACTCATATA TACTTTAGAT TGATTTAAAA CTTCAATTTT
AATTTAAAG GATCTAGGTG AAGATCCCTT TTGATAATCT CATGACCAAA ATCCCTTAAC GTGAGTTTC GTTCCACTGA
GCGTCAGACC CC

GGCC TTTTGCTGGC CTTTGTCTCA CATGTTCTTT CCTGCGTTAT CCCCTGATTC TGTGGATAAC
 CGTATTACCG CCTTTGAGTG AGCTGATACC GCTCGCCGCA GCCGAACGAC CGAGCGCAGC GAGTCAGTGA GCGAGGAAGC
 GGAAG

Lac-Promotor

Lac-Operator

Ribosomen-Bindungsstelle

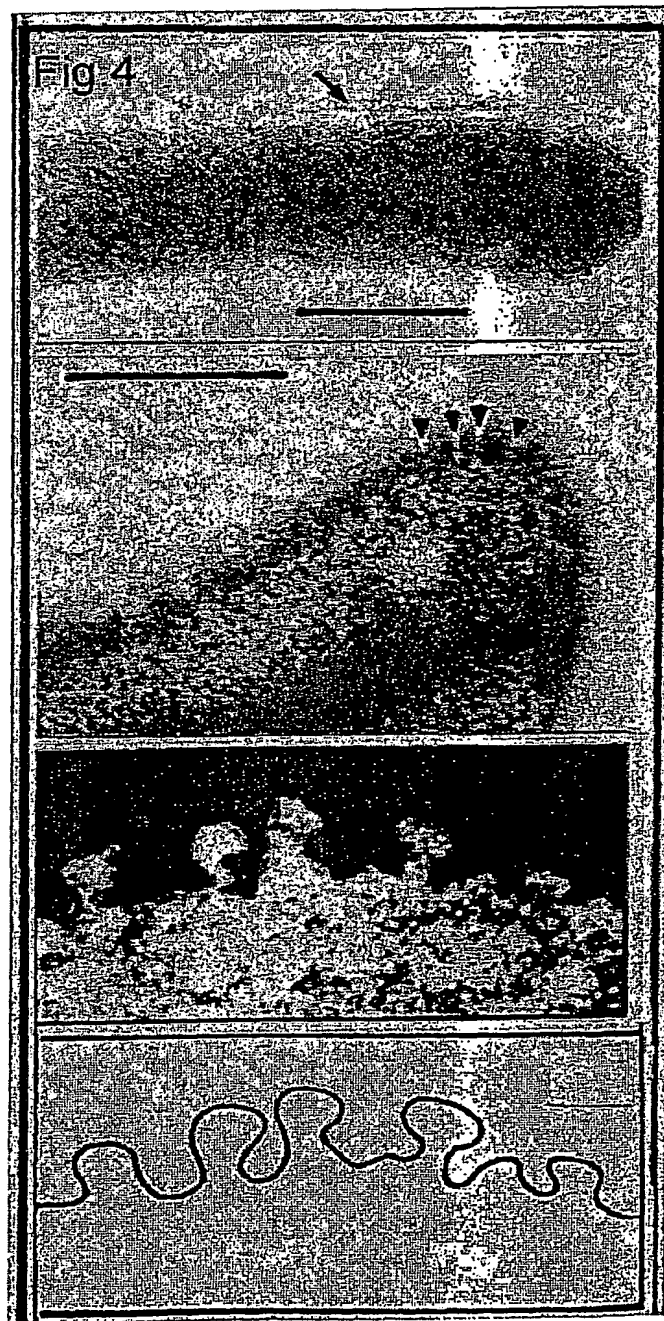
Ampicillin-Resistenz-Gen

pUC Plasmid-Replikations-Origin

5. CNECAG PstI
 6. CGATCG NcoI
 7. TGTACA BsrGI
 8. GAATTC EcoRI

Die Sequenz enthält eine silent mutation (), die laut Sequenzanalyse eindeutig vorhanden ist:

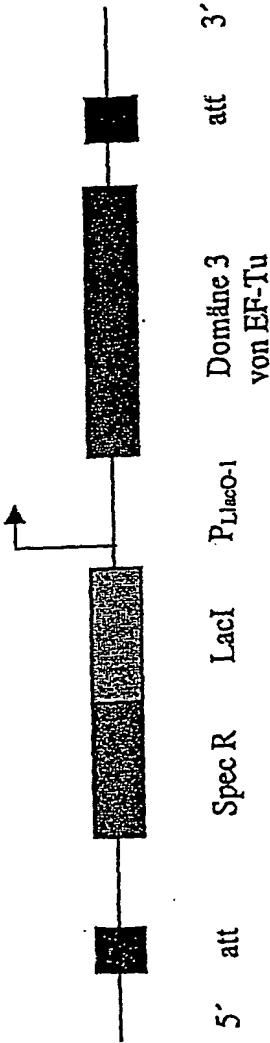
Soll: ATT, Ist: AT → Ile; Codon usage (gesamtes Genom E. coli) ändert sich von 30,3 zu 25,1 (Frequenz pro Tausend)







Figur 7



SEQUENZPROTOKOLL

<110> Novo Logix GmbH

<120> Zellaufschluss von Bakterien

<130> 28099PW0_CG

<140>

<141>

<150> DE 10229645.6

<151> 2002-07-02

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 4527

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

EF-Tu-GFP-His im Vektor pEGFP

<400> 1

```
agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttg gcc gattcattaa tgcagctggc 60
acgacagggt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc 120
tcactcatta ggcacccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa 180
ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccaagcttg 240
catgcctgca gcatgtctaa agaaaaattt gaacgtacaa aaccgcacgt taacgttgg 300
actatcg gcc acgttgacca cggtaaaact actctgaccg ctgcaatcac caccgtactg 360
gctaaaacct acggcggtgc tgctcgtgca ttcgaccaga tcgataacgc gccggaagaa 420
aaagctcgtg gtatcaccat caacacttct caggttgaat acgacacccc gaccgcgtcac 480
tacgcacacg tagactgcc ggggcacgcc gactatgtta aaaacatgat caccggtgct 540
gctcagatgg acggcgcgat cctggtagtt gctgcgactg acggcccgat gccgcagact 600
cgtgagcaca tcctgctggg tcgtcaggta ggcgttccgt acatcatcgt gttcctgaac 660
aaatgcgaca tggttgatga cgaagagctg ctggaactgg ttgaaatgga agttcgtgaa 720
cttctgtctc agtacgactt cccgggcgac gacactccga tcgttcgtgg ttctgctctg 780
aaagcgctgg aaggcgacgc agagtgggaa gcgaaaatcc tggaaactggc tggcttctctg 840
gattcttata ttccggaacc agagcgtgcg attgacaagc cgttcctgct gccgatcgaa 900
gacgtattct ccatctccgg tcgtggtacc gttgttaccg gtcgtgtaga acgcggtatc 960
atcaaagttg gtgaagaagt tgaaatcggt ggtatcaaag agactcagaa gtctacctgt 1020
actggcggtg aaatgttccg caaactgctg gacgaaggcc gtgctggtga gaacgtaggt 1080
gttctgctgc gtggtatcaa acgtgaagaa atcgaaacgtg gtcaggtact ggctaagccg 1140
ggcaccatca agccgcacac caagttcgaa tctgaagtg acattctgtc caaagatgaa 1200
```

ggcgccgctc atactccgtt cttcaaaggc taccgtccgc agttctactt ccgtactact 1260
 gacgtgactg gtaccatcga actgccggaa ggcgtagaga tggtaatgcc gggcgacaac 1320
 atcaaaatgg ttgttaccct gatccaccgg atcgcgatgg acgacgggtct gcgttttcgca 1380
 atccgtgaag gcggccgtac cggttgccgcg ggcgttgtag ctaaagttct gggcaagctt 1440
 accatggtga gcaagggcga ggagctgttc accgggggtg tgcccatcct ggtcgagctg 1500
 gacggcgacg taaacggcca caagttcagc gtgtccggcg agggcgaggg cgatgccacc 1560
 tacggcaagc tgaccctgaa gttcatctgc accaccggca agctgcccggt gccctggccc 1620
 accctcgtga ccaccctgac ctacggcggtg cagtgttca gccgtaccc cgaccacatg 1680
 aagcagcacg acttcttcaa gtccgccatg cccgaaggct acgtccagga gcgcaccatc 1740
 ttcttcaagg acgacggcaa ctacaagacc cgcgccgagg tgaagttcga gggcgacacc 1800
 ctggtgaacc gcatcgagct gaagggcatc gacttcaagg aggacggcaa catcctgggg 1860
 cacaagctgg agtacaacta caacagccac aacgtctata tcatggccga caagcagaag 1920
 aacggcatca aggtgaactt caagatccgc cacaacatcg aggacggcag cgtgcagctc 1980
 gccgaccact accagcagaa ccccccatc ggcgacggcc ccgtgctgct gcccgacaac 2040
 cactacctga gcaccagtc cgcctgagc aaagaccca acgagaagcg cgatcacatg 2100
 gtccgtgctg agttcgtgac cgcgcgcggg atcactctcg gcatggacga gctgtacaag 2160
 cttcatcacc atcaccatca ctaactgtac aagtaagaat cccaactgag cgcgggtcgc 2220
 taccattacc aacttgtctg gtgtcaaaaa taataggcct actagtcggc cgtacggggc 2280
 ctttcgtctc gcgcgtttcg gtgatgacgg tgaaaacctc tgacacatgc agtcccggga 2340
 gacggtcaca gcttgtctgt aagcggatgc cgggagcaga caagcccgtc agggcgcgctc 2400
 agcgggtggt ggcgggtgtc ggggctggct taactatgcg gcatcagagc agattgtact 2460
 gagagtgcac catatgcggt gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat 2520
 caggcggcct taagggcctc gtgatacgcc tatttttata ggttaatgtc atgataataa 2580
 tggtttctta gacgtcaggt ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc cctatttgtt 2640
 tatttttcta aatacattca aatatgtatc cgctcatgag acaataacc tgataaatgc 2700
 ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca tttccgtgtc gcccttattc 2760
 ctttttttgc ggcattttgc cttcctgttt ttgctcacc agaaacgctg gtgaaagtaa 2820
 aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg 2880
 gtaagatcct tgagagtttt cgcgccgaag aacgttttcc aatgatgagc acttttaaaag 2940
 ttctgctatg tggcgcggta ttatcccgta ttgacgccg gcaagagcaa ctcggtcgcc 3000
 gcatacacta ttctcagaat gacttggtt agtactcacc agtcacagaa aagcatctta 3060
 cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgcat aaccatgagt gataacactg 3120
 cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca 3180
 acatggggga tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac 3240
 caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg cgaaactat 3300
 taactggcga actacttact ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg 3360
 ataaagttgc aggaccactt ctgcgctcgg cccttcgggc tggctgggtt attgctgata 3420
 aatctggagc cgggtgagcgt gggctctcgc gtatcattgc agcaactggg ccagatggta 3480
 agccctcccg tatcgtagtt atctacacga cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa 3540
 atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttggtaactg tcagaccaag 3600
 ttactcata tatactttag attgatttaa aacttcattt ttaatttaa aggatctagg 3660
 tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact 3720
 gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg 3780
 taatctgctg cttgcaaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtgggttgt ttgccggatc 3840
 aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgagc ataccaaata 3900
 ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgccta 3960
 catacctcgc tctgctaata ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc 4020
 ttaccggggt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggctg ggctgaacgg 4080

```

gggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgaccta caccgaactg agatacctac 4140
agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaagggag aaaggcggac aggtatccgg 4200
taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgca cgagggagct tccaggggga aacgcctggt 4260
atctttatag tcctgtcggg ttctgccacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct 4320
cgtcaggggg gcgagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg 4380
ccttttgctg gccttttgct cacatgttct ttctgcgtt atcccctgat tctgtggata 4440
accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctcgccg cagccgaacg accgagcgca 4500
gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaag                                     4527

```

<210> 2

<211> 3651

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Domäne 3 von
EF-Tu-GFP-His im Vektor pEGFP

<400> 2

```

acgcgccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc 60
acgacaggtt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc 120
tcactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtagt ttgtgtggaa 180
ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccaaagctt 240
catgcctgca gcgctaagcc gggcaccatc aagccgcaca ccaagttoga atctgaagt 300
tacattctgt ccaaagatga aggcggccgt catactccgt tcttcaaagg ctaccgtccg 360
cagttctact tccgtactac tgacgtgact ggtaccatcg aactgccgga aggcgtagag 420
atggtaatgc cgggcgacaa catcaaaatg gttgttacc tgcacccc gatcgcgatg 480
gacgacggtc tgcgtttcgc aatccgtgaa ggcggccgta ccgttggcgc ggcggttgta 540
gctaaagttc tgggctgcaa gcttaccatg gtgagcaagg gcgaggagct gttcaccggg 600
gtggtgccca tcctggtcga gctggacggc gacgtaaacg gccacaagtt cagcgtgtcc 660
ggcgagggcg agggcgatgc cacctacggc aagctgaccc tgaagttcat ctgcaccacc 720
ggcaagctgc ccgtgccctg gccaccctc gtgaccacc tgacctacgg cgtgcagtgc 780
ttcagccgct accccgacca catgaagcag cagcacttct tcaagtcgcg catgcccgaa 840
ggctacgtcc aggagcgcac catcttcttc aaggacgacg gcaactacaa gacccgcgcc 900
gaggtgaagt tcgagggcga caccctggtg aaccgcatcg agctgaaggg catcgacttc 960
aaggaggacg gcaacatcct ggggcacaag ctggagtaca actacaacag ccacaacgtc 1020
tatatcatgg ccgacaagca gaagaacggc atcaaggtga acttcaagat ccgccacaac 1080
atcgaggacg gcagcgtgca gctcgccgac cactaccagc agaacacccc catcgccgac 1140
ggccccgtgc tgctgccgca caaccactac ctgagcacc agtccgccct gagcaaagac 1200
cccaacgaga agcgcgatca catggtcctg ctggagttcg tgaccgccgc cgggatcact 1260
ctcggcatgg acgagctgta caagcttcat caccatcacc atcactaact gtacaagtaa 1320
gaatcccaac tgagcgccg tgcctaccat taccaacttg tctggtgtca aaaataatag 1380
gcctactagt cggccgtacg ggccctttcg tctcgcgctt ttcggtgatg acggtgaaaa 1440
cctctgacac atgcagctcc cggagacggc cacagcttgt ctgtaagcgg atgccgggag 1500
cagacaagcc cgtcagggcg cgtcagcggg tgttgccggg tgcgggggct ggcttaacta 1560
tgccgcatca gagcagattg tactgagagt gcaccatatg cgggtgtgaaa taccgcacag 1620
atgcgtaagg agaaaatacc gcatcaggcg gccttaaggg cctcgtgata cgcctatatt 1680

```

tataggttaa tgtcatgata ataatggttt cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa 1740
atgtgcgcgg aaccocctatt tgtttatatt tctaaatata ttcaaataatg tatccgctca 1800
tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc 1860
aacatttccg tgtcgccctt attccctttt ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc 1920
accagaaac gctgggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt 1980
acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt 2040
ttccaatgat gagcactttt aaagtctctg tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg 2100
ccgggcaaga gcaactcggg cgccgcatac actattctca gaatgacttg gttgagtact 2160
caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtctg 2220
ccataaccat gagtgataac actgcggcca acttacttct gacaacgatc ggaggaccga 2280
aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt gatcggtggg 2340
aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa 2400
tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact tactctagct tccgggcaac 2460
aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc 2520
cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca 2580
ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac acgacgggga 2640
gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgtga gatagggtgcc tcaactgatta 2700
agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact ttagattgat ttaaaacttc 2760
atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg accaaaatcc 2820
cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt cagaccccg agaaaagatc aaaggatctt 2880
cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac 2940
cagcgggtgg ttgtttgccc gatcaagagc taccaactct ttttcogaag gtaactggct 3000
tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact 3060
tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg 3120
ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttgactc aagacgatag ttaccggata 3180
aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga 3240
cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag 3300
ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaaagc gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg 3360
agcttccagg gggaaacgcc tggatatctt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac 3420
ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcgag cctatggaaa aacgccagca 3480
acgcggcctt ttacaggttc ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg 3540
cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt tgagttagct gataccgctc 3600
gccgcagccg aacgaccgag cgcagcaggt cagttagcga ggaagcggaa g 3651

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.